

10/509595

PCT/JP 03/03307 #2
Rec'd CT/PTO 29 SEP 2004

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

19.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月29日

出願番号

Application Number:

特願2002-093443

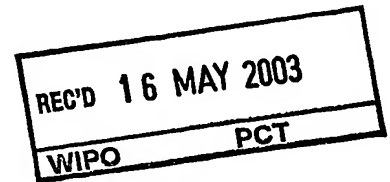
[ST.10/C]:

[JP2002-093443]

出願人

Applicant(s):

シスメックス株式会社

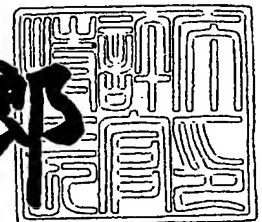


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3031576

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1030

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 浅野 薫

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 高畑 隆之

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 沼田 成弘

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 眞砂 明典

【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内

【氏名】 高地 泰浩

【特許出願人】

【識別番号】 390014960

【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200385

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 緑内障発症リスク判断のための遺伝子検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域における少なくとも2箇所以上の塩基の変異を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法。

【請求項2】 緑内障関連遺伝子がミオシリン（MYOC）遺伝子である請求項1に記載の検査方法。

【請求項3】 遺伝子領域が配列番号1で示される塩基配列である請求項1または2に記載の検査方法。

【請求項4】 配列番号1で示される塩基配列における194位のCからAへの置換；199位のAからCへの置換；324位のGからAへの置換；1051位のCからTへの置換；1084位のCからTへの置換；1627位のTからCへの置換；1685位のTからCへの置換；1756位のCからTへの置換；1853位のGからCへの置換；2830位のGからAへの置換；3371位のAからGへの置換；4037位のGからAへの置換；4346位のGからAへの置換からなる群のいずれかを検出する請求項3に記載の検査方法。

【請求項5】 配列番号1で示される塩基配列における194位のCからAへの置換；1084位のCからTへの置換；1627位のTからCへの置換；4037位のGからAへの置換；4346位のGからAへの置換からなる群の少なくとも2以上の同時置換を検出する請求項3に記載の検査方法。

【請求項6】 配列番号1で示される塩基配列における1051位のCからTへの置換；1685位のTからCへの置換；1756位のCからTへの置換；1853位のGからCへの置換からなる群の少なくとも2以上の同時置換を検出する請求項3に記載の検査方法。

【請求項7】 配列番号1で示される塩基配列における199位のAからCへの置換；324位のGからAへの置換；1051位のCからTへの置換；1084位のCからTへの置換；1627位のTからCへの置換；1685位のTからCへの置換；1756位のCからTへの置換；1853位のGからCへの置換

；2830位のGからAへの置換；3371位のAからGへの置換からなる群の少なくとも1の置換を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法。

【請求項8】 緑内障が原発性開放隅角緑内障および／または正常眼圧緑内障である請求項1～7のいずれか1に記載の検査方法。

【請求項9】 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドを用いて変異を検出することを特徴とする請求項1～8のいずれか1に記載の検査方法。

【請求項10】 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドが、以下に表される配列からなるオリゴヌクレオチドの群より少なくとも1以上選択され、プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド；

1) 配列番号2から27のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、

2) 前記1)に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖。

3) 前記1) または2)に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド。

4) 前記1)～3)のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドと約60%の相同性を有するオリゴヌクレオチド。

5) 前記1)～4)に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項11】 請求項9に記載のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1のオリゴヌクレオチドを用いて核酸増幅処理方法を行うことを含む請求項8に記載の検査方法。

【請求項12】 請求項1～9または11のいずれか1に記載の検査方法に使用する試薬を含んでなる検査用試薬または検査用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床検査の分野における緑内障関連遺伝子の検査方法および該遺伝子の変異を指標として緑内障発症リスクを予測するための検査方法に関する。例えば緑内障遺伝子として知られているミオシリン（以下「MYOC」という。）遺伝子の異常を検出し、該検出された異常、すなわち遺伝子の特定位置における塩基の変異を指標として緑内障を診断する遺伝子の検査方法、特に個体について将来発症する可能性を予知するための検査方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

緑内障は、目の中にある房水が排出されない状態となり、目圧が上がって目の機能が落ちる疾患である。放置しておく、見える範囲が狭まったり、視力が落ちたりして失明する。ただし、眼圧が正常にも関わらず、視神経に障害をきたす場合がある。

【 0 0 0 3 】

緑内障は、原発性開放隅角緑内障（POAG）、正常眼圧緑内障（NTG）、原発性閉鎖隅角緑内障（PACG）、先天性緑内障および続発性緑内障の5つの病態に分類され、緑内障の20%が遺伝性のものと言われている。これらのうち、最も多いのがPOAGである。1988年から1989年にかけて社団法人日本眼科医会が実施した全国疫学調査によると、40歳以上の人口のうち3.56%が緑内障患者であると報告されている。

【 0 0 0 4 】

緑内障の主な危険因子は家族歴であり、その発症には遺伝子が関与していることが強く示唆される。1996年5月17日に出願されたNguyenらの米国特許第5,789,169号において、緑内障関連遺伝子としてTIGR（小柱網誘導グルコシルチコイド応答）タンパク質をコードする遺伝子が開示された。TIGR遺伝子は、別名MYOC遺伝子としても知られている。Nguyenらの米国特許第5,789,169号はまた、そのタンパク質のcDNA配列、タンパク質自身、それに結合する分子、および結合分子をコードする核酸分子を開示しており、また緑内障および関連疾患

の診断、ならびに心血管疾患、免疫疾患または該タンパク質の発現や活性に影響する他の疾患や状態といった他の疾患または状態の診断のための改善された方法および試薬を提供した。また、緑内障関連遺伝子のうちCYP1B1遺伝子における突然変異を検出し、該突然変異の存在を緑内障の指標として個体における緑内障の診断を行う方法も開示されている（特表2001-512969号公表公報）。しかしながら、これらは緑内障関連遺伝子と緑内障の関係に着目しているものの、将来における緑内障の発症リスクを効果的に予知する手段を開示するものではない。

【0005】

一方、WO 01/88120 A1 国際公開公報では、該公報の配列表に示すMYOC遺伝子のプロモーター領域である-153位の遺伝子の変異を検出する方法が開示され、遺伝性が心配される家系や未発症キャリアーであることが心配される患者においては、緑内障のスクリーニングとして使用することができることが示されている。しかしながら、ここでは-153位の1箇所の変異に着目し、これを指標としているのみである。

緑内障は潜行性であるため、視神経に対し重大な損傷が起る前に予防また軽減する方法をとることができるように、緑内障が発生する可能性を早期に診断または効果的に予測する一層優れた方法が要望されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

遺伝的に緑内障の危険因子を保有し、将来における発症リスクが高い個体を特定し、その個体に関して重点的に緑内障の検査を実施することができれば、効率的に緑内障の早期発見、早期治療をなしうると考えられる。係る状況に鑑みて、本発明は緑内障関連遺伝子と緑内障発症の関係から、緑内障の発症リスクを効果的に予知するための遺伝子の検査方法を提供する事を課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、緑内障の発症が遺伝子の変異に関与することに着目し、緑内障患者および非患者の緑内障原因遺伝子の上流領域およびコード領域の遺伝子配列

の分析を行い、鋭意研究を重ねた結果、該遺伝子に患者群と非患者群で頻度に差が観察される遺伝的多型が存在することを見出した。さらに、この遺伝的多型の有無により緑内障の有病率が一般集団の有病率と比較した場合に統計的に有意に変化することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、

1. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域における少なくとも2箇所以上の塩基の変異を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法、
2. 緑内障関連遺伝子がミオシリン（MYOC）遺伝子である前項1に記載の検査方法、
3. 連遺伝子領域が配列番号1で示される塩基配列である前項1または2に記載の検査方法、
4. 配列番号1で示される塩基配列における194位のCからAへの置換；199位のAからCへの置換；324位のGからAへの置換；1051位のCからTへの置換；1084位のCからTへの置換；1627位のTからCへの置換；1685位のTからCへの置換；1756位のCからTへの置換；1853位のGからCへの置換；2830位のGからAへの置換；3371位のAからGへの置換；4037位のGからAへの置換；4346位のGからAへの置換からなる群のいずれかを検出する前項3に記載の検査方法、
5. 配列番号1で示される塩基配列における194位のCからAへの置換；1084位のCからTへの置換；1627位のTからCへの置換；4037位のGからAへの置換；4346位のGからAへの置換からなる群の少なくとも2以上の同時置換を検出する前項3に記載の検査方法、
6. 配列番号1で示される塩基配列における1051位のCからTへの置換；1685位のTからCへの置換；1756位のCからTへの置換；1853位のGからCへの置換からなる群の少なくとも2以上の同時置換を検出する前項3に記載の検査方法、
7. 配列番号1で示される塩基配列における199位のAからCへの置換；32

4位のGからAへの置換；1051位のCからTへの置換；1084位のCからTへの置換；1627位のTからCへの置換；1685位のTからCへの置換；1756位のCからTへの置換；1853位のGからCへの置換；2830位のGからAへの置換；3371位のAからGへの置換からなる群の少なくとも1の置換を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法、

8. 緑内障が原発性開放隅角緑内障および／または正常眼圧緑内障である前項1～7のいずれか1に記載の検査方法、

9. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドを用いて変異を検出することを特徴とする前項1～8のいずれか1に記載の検査方法、

10. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドが、以下に表される配列を含むオリゴヌクレオチドの群より少なくとも1以上選択され、プライマーとして使用するオリゴヌクレオチド；

1) 前記1)から27のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

2) 前記1)に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖。

3) 前記1)または2)に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド。

4) 前記1)～3)のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドと約60%の相同性を有するオリゴヌクレオチド。

5) 前記1)～4)に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、

11. 前項9に記載のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも1のオリゴヌクレオチドを用いて核酸増幅処理方法を行うことを含む前項8に記載の検査方法、

12. 前項1～9または11のいずれか1に記載の検査方法に使用する試薬を含

んでなる検査用試薬または検査用試薬キット、からなる。

【0009】

【発明の実施の形態】

発明者らは、緑内障患者および非患者において、配列番号1に示される塩基配列からなる緑内障原因遺伝子の翻訳開始点から4120塩基にわたる上流領域および翻訳開始点以降のコード領域の遺伝子配列の決定を行った。その過程において、該遺伝子上流領域およびコード領域に患者群と非患者群で頻度に差が観察される遺伝的多型が存在することを確認した。さらに、この遺伝的多型の有無の検討によって、緑内障の有病率が一般集団の有病率と比較した場合に統計的に有意に変化する事実を見出した。本発明は、上記新知見に基づいて構成される。

【0010】

(緑内障関連遺伝子)

本発明における、緑内障関連遺伝子の例としてTIGR (小柱網誘導グルコシルチコイド応答) 遺伝子が挙げられる。このTIGR遺伝子は、MYOC遺伝子としても知られている。MYOC遺伝子上流およびコード領域の構造および配列は、図1および配列番号1に表されているとおりであり、例えばプロモーター要素を有する上流領域およびタンパク質をコードするコード領域ならびに他の要素がある。該MYOC遺伝子の塩基の位置は、配列番号1において定めた塩基番号に従う (Genbank 受入番号 NT_029874)。このMYOCタンパク質をコードする領域は、三個のエキソンから構成される。配列番号1の1～4120位は上流領域であり、4120～4722位はエキソン1を表す。

【0011】

(遺伝子の変異)

本発明の緑内障関連遺伝子の変異とは、MYOC遺伝子の塩基配列中の特定位置の塩基が異なる塩基に置換されることをいう。該特定位置は、配列番号1に示される塩基配列の194位、199位、324位、1051位、1084位、1627位、1685位、1756位、1853位、2830位、3371位、4037位および／または4346位から選択される位置をいう。

【0012】

本発明における特定位置での具体的な塩基の置換は、配列番号 1 で示される塩基配列の 1 9 4 位の C から A へ； 1 9 9 位の A から C へ； 3 2 4 位の G から A へ； 1 0 5 1 位の C から T へ； 1 0 8 4 位の C から T へ； 1 6 2 7 位の T から C へ； 1 6 8 5 位の T から C へ； 1 7 5 6 位の C から T へ； 1 8 5 3 位の G から C へ； 2 8 3 0 位の G から A へ； 3 3 7 1 位の A から G へ； 4 0 3 7 位の G から A へ； 4 3 4 6 位の G から A への置換が挙げられる。

【0013】

好ましくは、配列番号 1 で示される塩基配列の 1 9 9 位； 3 2 4 位； 1 0 5 1 位； 1 0 8 4 位； 1 6 2 7 位； 1 6 8 5 位； 1 7 5 6 位； 1 8 5 3 位； 2 8 3 0 位の； 3 3 7 1 位の塩基について少なくとも 1 の置換を検出し、遺伝子の検査を行う。さらに、 1 9 4 位； 1 9 9 位； 3 2 4 位； 1 0 5 1 位； 1 0 8 4 位； 1 6 2 7 位； 1 6 8 5 位； 1 7 5 6 位； 1 8 5 3 位； 2 8 3 0 位； 3 3 7 1 位； 4 0 3 7 位； 4 3 4 6 位の塩基から少なくとも 2 以上の置換を検出することがより好ましい。

【0014】

(検査方法)

当該遺伝子の変異の検査方法は、本発明によって開示する MYOC 遺伝子の特定の変異を検出する限りにおいて、その手法は何ら限定されるものではなく、公知もしくは将来得られうる各種の方法を広く用いることができる。

被験者の MYOC 遺伝子について本発明で開示される変異を検査するために、当該変異位置を含む塩基配列を解析する各種の方法を用いることができる。これらの方法としては、例えばサザンハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法 (J. Mol. Biol., 98: 503-517 (1975) 等参照)、ジデオキシ塩基配列決定法 (サンガー法)、DNA の増幅手法を組合せた各種の検出法 [例えば PCR-制限酵素断片長多型分析法 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism)、PCR-単鎖高次構造多型分析法 (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86: 2766-2770 (1989) 等参照)、PCR-特異的配列オリゴヌクレオチド法 (SSO: Specific sequence oligonucleotide)、PCR-SSO とドットハイブリダイゼーション法を用いる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法 (Nature,

324: 163-166 (1986)等参照)] 等を例示することができる。本発明によって検出すべき遺伝子変異の位置が開示され特定されている以上、当業者にとっては公知の方法を用いてその変異を検出することができる。

【0015】

(検査用試料の調製)

被験者のMYOC遺伝子を解析するために、本発明の検査方法に供される検査用試料は、被験者のMYOC遺伝子を含む生物学的試料であれば良く、特に限定されない。このような生物学的試料としては、生体材料組織、手術切除組織、口腔粘膜組織等の生体から採取した組織の他、血液、血清、糞便、射出精液、喀痰、唾液、脳脊髄液、毛髪等が挙げられる。例えばブレンダーを用いて組織等の生物学的試料を破砕し、フェノール・クロロホルム法などの公知の遺伝子抽出方法で抽出したMYOC遺伝子を被検用試料とすることができる。さらに抽出したMYOC遺伝子を増幅し、濃縮したものを被検用試料とすることができる。

【0016】

ここで、被検用試料は、MYOC遺伝子の全長DNAでもよく、DNA断片(部分DNA)でもよい。DNA断片が検査に供される場合には、MYOC遺伝子上流領域および/またはコード領域を含み、少なくとも1箇所以上、好ましくは2箇所以上、より好ましくは3箇所以上の変異にかかる特定位置を含むことが必要である。当該DNA断片は、本発明の遺伝子変異の検出に利用できるもの、即ち、塩基置換の測定のために供される被験DNAとしての測定可能な塩基長を有するものであれば、特にその塩基長について制限はない。そのようなDNAの塩基長として、通常10塩基長程度以上、好ましくは20塩基長程度以上のものを選択することができ、一般的には100～1000程度の、好ましくは200～300程度の塩基長からなるものが選択される。

【0017】

また、被検用試料は、DNA、DNA転写産物のいずれであってもよい。具体的には、DNAより転写されたメッセンジャーRNA(mRNA)でもよいし、さらにそのmRNAから逆転写されたcDNA、あるいは相補DNAであってもよい。本発明の遺伝子変異の検出法において採用され得る各種の操作、例えば、

DNAまたはDNA断片の合成、DNAの切断、削除、付加または結合を目的とする酵素処理、DNAの単離、精製、複製、選択、DNA断片の増幅などはいずれも常法に従うことができる（分子遺伝学実験法、共立出版（株）1983年発行等参照）。またこれらは必要に応じて、適宜常法に従い修飾して用いることもできる。

【0018】

被検用試料を調製するための核酸の増幅は、例えばPCR法またはその変法に従って実施することができる（PCRテクノロジー、宝酒造（株）1990年発行等参照）。この場合、緑内障関連遺伝子の一部に特異的にハイブリッドを形成するオリゴヌクレオチド、具体的には変異にかかる上記特定位置を少なくとも1以上有する所望のDNA断片を特異的に増幅するように適宜選択したプライマー機能を有するオリゴヌクレオチドを利用することができる。

【0019】

（プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド）

プライマー機能を有するオリゴヌクレオチドとして、例えば1）配列番号2～27のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、2）前記1）に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖、3）前記1）または2）に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、4）前記1）～3）のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドと約60%の相同性を有するオリゴヌクレオチド、5）前記1）～4）に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

【0020】

オリゴヌクレオチドは、自体公知の方法により設計することができ、例えば化学的に合成することができる。あるいは、天然の核酸を制限酵素などによって切断し、上記のような塩基配列で構成されるように改変し、あるいは連結することも可能である。具体的には、オリゴヌクレオチド合成装置（アプライドバイオシステムズ社製 Expedite Model 8909 DNA合成機）等を用いて合成することができる。また、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異

させたオリゴヌクレオチドの合成法も、自体公知の製法を使用することができる。例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせ、例えば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual、2版、Sambrookら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年；[ラボマニュアル遺伝子工学]、村松正實編、丸善株式会社、1988年；[PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用]、Ehrlich, H.編、ストックトンプレス、1989年等に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmerの技術（Science(1983)219:666）を利用することができる。

【0021】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は一般に知られたものを選択することができ、その一例としては、50%ホルムアミド、5×SSC（150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム、pH7.2、5×塩化ナトリウム溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg/mlのDNA変異検出試薬、42℃で一晩ハイブリダイゼーションした後、室温で2×SSC・0.1% SDS中で一次洗浄し、次いで、約65℃において0.1×SSC・0.1% SDSで二次洗浄といった条件があげられる。

【0022】

（DNAの変異の検出）

DNAの変異は、例えば、被検用試料に含まれるMYOC遺伝子の塩基配列をサンガー法により決定し、検出することができる。

1本鎖の目的MYOC遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、これをプライマーとして5'から3'方向に相補鎖をDNAポリメラーゼによって合成させる。このときに使用するオリゴヌクレオチドは、例えば上記（プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド）で説明したオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用することができる。

【0023】

反応の基質として4種のデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）のほかに

少量のジデオキシヌクレオチド三リン酸 (ddNTP) を塩基ごとに別々に加え、相補鎖を合成させる。ddNTP はデオキシリボースの 3' 位の -OH 基が -H 基になっている dNTP のアナログ (類似物質) で、dNTP の代わりに ddNTP が取り込まれると、それ以上相補鎖が合成されなくなり、様々な長さの DNA が合成される。反応系に、例えば化学発光物質や放射性同位元素 (RI) で標識したプライマーや dNTP を加えることにより、合成される DNA を標識し、反応物を変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより塩基配列を決定することができる。

【0024】

サンガー法に用いる DNA ポリメラーゼとして、例えばクレノー (Klenow) 酵素、T7 ファージや好熱性細菌由来の DNA ポリメラーゼなどが挙げられる。これらは共通してエキソヌクレアーゼ活性を遺伝子工学的に除いてある。当初、サンガー法では目的の遺伝子を 1 本鎖 DNA にして用いていたが、現在では 2 本鎖プラスミドをそのままアルカリ変性させて用いる方法も多用されている。

【0025】

シーケンス反応はサンガー法またはシークエンス法により行うことができる。サイクルシーケンス法はサンガー法と PCR を組み合わせた方法で、鋳型 DNA を 1 本鎖にする必要はなく、反応系に DNA とプライマー 1 種類、dNTPs、ddNTPs、そして耐熱性の DNA ポリメラーゼを加えて行う。PCR 反応中に ddNTPs が取り込まれ、伸長が止まり、結果として 3' 末端が同一の塩基の DNA が合成される点はサンガー法と同じである。自動シーケンサーのシーケンス反応には、プライマーを蛍光標識した Dye primer 法と、ddNTP を蛍光標識した Dye terminator 法、さらに基質の dNTP に標識した Internal-label 法等がある。

【0026】

(検査用試薬および検査用試薬キット)

本発明はまた、緑内障の遺伝子検査方法に使用する検査試薬および検査試薬キットも含むものである。検査試薬としては、例えば被検試料増幅用プライマー、被検用試料の塩基配列決定用プライマー、各種ポリメラーゼ、塩基基質、標識物

質など本発明の方法に使用されるあらゆる試薬のいずれであっても良い。また、検査用試薬キットは本発明の方法に使用されるあらゆる試薬のうち少なくとも2以上をキットとして使用するものであれば良い。

【0027】

【実施例】

以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明する。但し、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0028】

【実施例1】

MYOC遺伝子のDNA解析

(1) DNAの抽出

被験者から提供を受けた血液を常法に従って処理し、有核細胞よりDNAを抽出した。DNA抽出キットとして製品名「Genとるくん™（血液用）」（宝酒造社製）を用い、同社の規定のプロトコールに従ってDNAを抽出した。

【0029】

(2) 鋳型DNAの増幅

得られたDNA抽出液を鋳型とし、PCR増幅用キット、製品名「LATaq（アプライドバイオシステムズ社製）」を用いてPCRにより、MYOC遺伝子の増幅を行った。増幅用プライマーはM-F1（配列番号：2）をセンスプライマー、M-R3（配列番号：3）をアンチセンスプライマーとして使用した。M-F1は配列番号1に表された塩基配列に基づく22-46位の領域に表された塩基配列、M-R3は5992-5968位の領域に表された塩基配列の相補的な配列からなる。反応は、94℃1分の加熱の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃5分30秒のサイクルを30回実施した。MYOC遺伝子のエキソン、翻訳開始点および上流領域の構造と、プライマーによって増幅される領域の位置関係は図1のとおりである。

【0030】

(3) DNA断片の配列決定

上記PCRにより得られたDNA断片について、自動DNAシーケンサーABI

Prism3100（アプライドバイオシステムズ社製）を用い、同製品規定のプロトコールに従ってDNAの塩基配列を決定した。このとき、次に示すプライマーを用いてサイクルシーケンス反応を行った。

【 0 0 3 1 】

配列番号1に表された塩基配列に基づく領域に含まれる塩基配列またはその相補的な配列からなる次の各配列番号に表されたオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用した。

順鎖：M-F 1	領域22-46位	（配列番号：2）、
M-S F 1	領域372-390位	（配列番号：4）、
M-S F 2	領域740-759位	（配列番号：5）、
M-S F 3	領域1093-1110位	（配列番号：6）、
M-S F 4	領域1456-1475位	（配列番号：7）、
M-S F 5	領域1800-1817位	（配列番号：8）、
M-S F 6	領域2148-2165位	（配列番号：9）、
M-S F 7	領域2498-2516位	（配列番号：10）、
M-S F 8	領域2857-2875位	（配列番号：11）、
M-S F 9	領域3227-3246位	（配列番号：12）、
M-S F 10	領域3601-3620位	（配列番号：13）、
M-S F 11	領域3910-3927位	（配列番号：14）、
逆鎖：M-S R 4	領域4730-4712位	相補配列（配列番号：15）、
M-S R 5	領域4337-4319位	相補配列（配列番号：16）、
M-S R 6	領域4022-4003位	相補配列（配列番号：17）、
M-S R 7	領域3712-3695位	相補配列（配列番号：18）、
M-S R 8	領域3379-3360位	相補配列（配列番号：19）、
M-S R 9	領域2950-2933位	相補配列（配列番号：20）、
M-S R 10	領域2593-2575位	相補配列（配列番号：21）、
M-S R 11	領域2259-2241位	相補配列（配列番号：22）、
M-S R 12	領域1950-1933位	相補配列（配列番号：23）、
M-S R 13	領域1556-1538位	相補配列（配列番号：24）、

M-SR14 領域1170-1153位 相補配列（配列番号：25）、

M-SR15 領域824-807位 相補配列（配列番号：26）、

M-SR16 領域470-453位 相補配列（配列番号：27）

上記プライマーのうち、M-F1からM-SF11までは順鎖、M-SR4からM-SR16までは逆鎖の配列を決定するために用いる。

【0032】

（4）DNA断片の連結およびMYOC遺伝子の塩基配列

さらに、各血液提供者毎のDNA断片の配列を、Phred/Phrapソフトウェア（米国ワシントン大学製）を用いて連結し、各血液サンプル提供者毎に1個の塩基配列を得た。

対照となる非患者ボランティア群67名から得られた血液を上記手法に従って処理し、非患者群で多数を占めるMYOC遺伝子の塩基配列（配列番号：1）を決定した。

【0033】

【実施例2】

（1）MYOC遺伝子の塩基配列の多型の解析1

医療機関によって開放隅角緑内障と診断された患者88名から得られた血液を上記実施例の手法に従って処理し、各提供者についてのMYOC遺伝子の塩基配列を調べ、非患者群の塩基配列と比較した。

その結果を表1に示す。表1の第1行は、配列番号1で表されるMYOC遺伝子の塩基配列の位置、第2行は各位置における非患者群で多数を占める塩基、第3行は非患者群における各塩基位置での変異の頻度、第4行は患者群における各塩基位置での変異の頻度、第5行が変異として検出された塩基の変化を示す。

その結果、塩基位置324位、4037位および4346位において、非患者群で約3%の頻度で変異を認め、患者群では6.8～10.2%の頻度で変異を認めた。その他の位置では、非患者群では全く変異を認めなかったのに対し、患者群では約1～3.4%の頻度で変異を認めた。

【0034】

【表1】

塩基位置	194	199	324	1051	1084	1627	1685	1756	1853	2830	3371	4037	4346
塩基	C	A	G	C	C	T	T	C	G	G	A	G	G
非患者群	0.0%	0.0%	3.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%	3.0%
患者群	3.4%	1.1%	8.8%	2.3%	3.4%	3.4%	2.3%	2.3%	2.3%	1.1%	1.1%	10.2%	10.2%
変異	C→A	A→C	G→A	C→T	C→T	T→C	T→C	C→T	G→C	G→A	A→G	G→A	G→A

【0035】

(2) MYOC遺伝子の塩基配列の多型の解析2

さらに、塩基位置4037位および4346位に変異を有していた患者11名および非患者2名について、他の位置での変異を調べた。

その結果を表2に示す。表2の第1行は塩基位置、第2行以下は各被験者での変異の有無を示す。

その結果、非患者群では塩基位置4037位および4346位の他の位置では変異を認めなかったのに対し、患者群では194位、1084位および1627位に変異を認める群、1051位、1685位、1756位および1853位に変異を認める群および変異を認めない群が認められた。

【0036】

【表2】

塩基位置	194	199	324	1051	1084	1627	1685	1756	1853	2830	3371	4037	4346
患者1	*				*	*						*	*
患者2	*				*	*						*	*
患者3	*				*	*						*	*
患者4												*	*
患者5												*	*
患者6												*	*
患者7												*	*
患者8												*	*
患者9												*	*
患者10				*			*	*	*				
患者11				*			*	*	*				
非患者1												*	*
非患者2												*	*

【0037】

(3) リスク判定

バイズの定理にしたがって、MYOC遺伝子の配列に変異を有する場合の緑内障発症のリスクを予測する。

ある被験者が緑内障を将来発症する確率は、事前に何の情報も無い場合には、疫学的に得られた一般集団における有病率で判断される。この有病率を $P(G)$ とし、緑内障を発症しない確率を $P(N)$ とすると、 $P(N) = 1 - P(G)$ と表される。

【0038】

一方、MYOC遺伝子の配列に単一もしくは複数の変異を有する場合をMとして、Mを保有するしている被験者が緑内障を将来発症する確率を条件付確率 $P(G|M)$ とする。ここで、もし $P(G|M) > P(G)$ であるならば、その変異Mを保有している被験者は将来緑内障を発症する確率が一般集団よりも高いことになり、高リスク者と判定される。

【0039】

条件付確率 $P(G|M)$ は、以下のように算出される。

緑内障患者群においてMを保有する確率を $P(M|G)$ 、非患者においてMを保有する確率を $P(M|N)$ とする。ベイズの定理(図2)より、 $P(M|N)$ は式1で示される。(G) には、1988年から1989年にかけて社団法人日本眼科医会が実施した全日本緑内障調査によると、40歳以上の人口のうち3.56%が緑内障患者であると報告されている数値を引用することができる。さらに、緑内障患者および非患者の各位置におけるMYOC遺伝子の塩基の変異の確率を、各々式1、 $P(M|G)$ 値、 $P(M|N)$ 値にあてはめることができる。

【0040】

【式1】

$$P(G|M) = \frac{P(G) \times P(M|G)}{P(G) \times P(M|G) + P(N) \times P(M|N)}$$

【0041】

以上の数式を用いて各変異について $P(G|M)$ を算出したところ、194位=28.1、199位=28.1、324位=2.184、1051位=28.1、1084位=28.1、1627位=28.1、1685位=28.1、1756位=28.1、1853位=2

8.1、2830位=28.1、3371位=28.1、4037位=3.2、4346位=3.2の割合で、 $P(G)$ よりも $P(G|M)$ の数値が高く算出され、これらの位置で変異を有することが緑内障の高リスク群であることを示すことが判明した。このことより、上記遺伝子の位置における変異を検出することが、開放隅角緑内障の発症リスクの予知に有効であることが確認された。

【0042】

(5) リスク判定のために有効な検査

さらに、リスク判定を有効に行うためのMYOC遺伝子の変異の位置について解析し、その結果を表2に示した。

4037位または、4346位に変異を有する患者の確率は約10%であるから、当該位置に変異を有する者の緑内障発症のリスクがまず判断できる。また、この位置に変異を有する患者はいずれもその双方に変異を有している。したがって、4037位または4346位のいずれか一方の変異を検出し、指標とすることにより緑内障発症リスク判定することができる。

【0043】

しかし、非患者群でも4037位、4346位に変異を有する患者の確率は各々約3%である。一方、4037位、4346位に変異を有する者のうち、194位、1084位および1627位の全てに変異を有する者は全て患者（患者1、患者2、患者3）であった。したがって、4037位または4346位のいずれか一方の変異に加えて、さらに194位、1084位および1627位のいずれか少なくとも1箇所の変異を検出し指標とすることで、偽陽性の判定を回避し緑内障発症の予測を行うことができる。

【0044】

また、同様に1084位、1685位、1756位、1853位の全てに変異を有する者も全て患者（患者10、患者11）であった。したがって、1084位、1685位、1756位および1853位のいずれか少なくとも1箇所の変異を検出し指標とすることで、偽陽性の判定を回避し緑内障発症の予測を行うことができる。

【0045】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明にかかる遺伝子の変異に関する情報は、緑内障の将来における発症予測に有効である。本発明の遺伝子検査方法によりMYOC遺伝子の変異を検出することで、特に開放隅角緑内障の発症を予測することができれば、発症前の段階で発症予防または早期に治療することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

MYOC 遺伝子の構造およびプライマーの位置関係を示す図である。

(実施例 1)

【図 2】

ベイズの定理の説明を示す図である。(実施例 2)

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sysmex Corporation

<120> A check up method for Glaucoma

<130> NP02-1030

<140>

<141>

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6000

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gctccacagg aagtctcccc actctagact tctgcatcac gatgttacag ccagaagctc 60
 cgtgagggtg aggggtctgtg tcttacacct acctgtatgc tctacacctg agctcactgc 120
 aaacctctgcc tcccaggttc aagcaattct cctgtctcag cctcccgct agctgggact 180
 acaggcgcac gcccggttaa tttttgtatt gttagtagag atgggggttc accatattag 240
 cccggctggt cttgaactcc tgacctcagg tgatccaccc acctcagcct cctaaagtgc 300
 tgggattaca ggcatgagtc accgcgcccc gccaaagggtc agtgtttaac aaggaataac 360
 ttgaatggtt tactaaacca acagggaac agacaaaagc tgtgataatt tcagggattc 420
 ttgggatggg gaatggtgcc atgagctgcc tgcctagtcc cagaccactg gtcctcatca 480
 ctttcttccc tcctcctcat tttcaggcta agttaccatt tcttaccaca tgcttttgtg 540
 gtaagcctcc acatcggttac tgaaataaga gtatacatga tttggggcca 600
 tctgtgtgtg tgtatagggg aggagggcat accccagaga tcttgaag cccccggcag 660
 aggtttcctc tccagctggg ggagccctgc aagcaccgga ggtcctgggt gtcctgagca 720
 acctgccagc ccgtgccact ggttgttttg ttatcactct ctagggacct gttgctttct 780
 atttctgtgt gactcgttca ttcattccagg cattcattga caatttattg agtacttata 840
 tctgccagac accagagaca aaatggtgag caaagcagtc actgccctac cttcgtggag 900
 gtgacagttt ctcattggaag acgtgcagaa gaaaattaat agccagccaa cttaaaccac 960
 gtgctgaaag aaaggaaata aacaccatct tgaagaattg tgcgcagcat cccttaacaa 1020
 ggccacctcc ctacgcctcc ctgctgcctc catcgtgccc ggaggccccc aagcccagat 1080
 cttccaagcc tctcctcca tcagtcacag cgctgcagct ggctgcctc gcttcccgtg 1140
 aatcgtcctg gtgcatctga gctggagact ccttggctcc aggctccaga aaggaaatgg 1200
 agagggaac tagtctaacg gagaatctgg aggggacagt gtttctcag agggaaaggg 1260
 gcctccacgt ccaggagaat tccaggaggt ggggactgca gggagtgggg acgctggggc 1320
 tgagcgggtg ctgaaaggca ggaagggtgaa aagggaagg ctgaagctgc ccagatgttc 1380
 agtgttgttc acggggctgg gagttttccg ttgcttctg tgagcctttt tatcttttct 1440

ctgcttggag gagaagaagt ctatttcattg aagggatgca gtttcataaa gtcagctgtt 1500
 aaaattccag ggtgtgcatg ggttttcctt cacgaaggcc tttatttaaat gggaatatag 1560
 gaagcgagct catttcctag gccgttaatt cacggaagaa gtgactggag tcttttcttt 1620
 catgtcttct gggcaactac tcagccctgt ggtggacttg gcttatgcaa gacggtcgaa 1680
 aaccttgaa tcaggagact cggttttctt tctggttctg ccattgggtg gctgtgagac 1740
 cgtgggcaag tgtctctcct tccctgggcc atagtcttct ctgctataaa gaccttgca 1800
 gctctcgtgt tctgtgaaca cttccctgtg attctctgtg aggggggatg ttgagagggg 1860
 aaggaggcag agctggagca gctgagccac aggggagggtg gagggggaca ggaaggcagg 1920
 cagaagctgg gtgctccatc agtcctcact gatcacgtca gactccagga ccgagagcca 1980
 caatgcttca ggaaagctca atgaacccaa cagccacatt ttccttcctt aagcatagac 2040
 aatggcattt gccataacc aaaaagaatg cagagactaa ctggtggttag cttttgcctg 2100
 gcattcaaaa actgggccag agcaagtggg aaatgccaga gattgttaaa cttttcacc 2160
 tgaccagcac cccacgcagc tcagcagtga ctgctgacag cacggagtga cctgcagcgc 2220
 aggggaggag aagaaaaaga gtttcacagt gtatgagcaa gaaagacaga ttcatccaag 2280
 ggcagtggga attgaccagt gctgtgagc tccacgtgat cctgggttct aggaggcagg 2340
 gctatattgt ggggggaaaa cctgtgagc agggaagtcg ggagacctga tttctaatac 2400
 tatatttttc ctttacaagc tgagtaattc tgagcaagtc acaaggtagt aactgaggct 2460
 gtaagattac ttagtttctc cttattagga actctttttc tctgtggagt tagcagcaca 2520
 agggcaatcc cgtttctttt aacaggaaga aaacattcct aagagtaaag ccaaacagat 2580
 tcaagcctag gtcttgctga ctatatgatt ggttttttga aaaatcattt cagcgatgtt 2640
 tactatctga ttcagaaaat gagactagta ccttttggtc agctgtaaac aaacacccat 2700
 ttgtaaatgt ctcaagtcca ggcttaactg cagaaccaat caaataagaa tagaatcttt 2760
 agagcaaact gtgtttctcc actctggagg tgagtctgcc agggcagttt ggaaatattt 2820
 acttcacaag tattgacact gttgttggtg ttaacaacat aaagttgctc aaaggcaatc 2880
 attatttcaa gtggcttaaa gttacttctg acagttttgg tatatttatt ggctattgcc 2940
 atttgctttt tgttttttct ctttgggttt attaagttaa agcagggatt attaacctac 3000
 agtccagaaa gcctgtgaat ttgaatgagg aaaaaattac atttttgttt ttaccacctt 3060
 ctaactaaat ttaacatttt attccattgc gaatagagcc ataaactcaa agtggttaata 3120
 acagtacctg tgattttgtc attaccaata gaaatcacag acattttata ctatattaca 3180

gttgttgacg atacgttgta agtgaaatat ttatactcaa aactactttg aaattagacc 3240
 tcctgctgga tcttgttttt aacatattaa taaaacatgt ttaaaatttt gatattttga 3300
 taatcatatt tcattatcat ttgtttccit tgtaatctat attttatata ttgaaaaca 3360
 tctttctgag aagagttccc cagatttcac caatgagggt cttggcatgc acacacacag 3420
 agtaagaact gatttagagg ctaacattga cattgggtgcc tgagatgcaa gactgaaatt 3480
 agaaagttct cccaaagata cacagttggt ttaaagctag gggtgagggg ggaaatctgc 3540
 cgcttctata ggaatgctct ccctggagcc tggtaggggt ctgtccttgt gttctggctg 3600
 gctgttattt ttctctgtcc ctgctacgtc ttaaaggact tgtttgatc tccagttcct 3660
 agcatagtgc ctggcacagt gcaggttctc aatgagtttg cagagtgaat ggaaatataa 3720
 actagaaata tatccttggt gaaatcagca caccagtagt cctgggtgtaa gtgtgtgtac 3780
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtaaaa ccagggtggag atataggaac tattattggg 3840
 gtatgggtgc ataaattggg atgttctttt taaaagaaa ctccaaacag acttctggaa 3900
 ggttattttc taagaatctt gctggcagcg tgaaggcaac cccctgtgc acagccccac 3960
 ccaggtctac gtggccacct ctgtcttccc ccatgaaggg ctggctcccc agtatatata 4020
 gctctctcag agctcgggc atgagccagc aaggccaccc atccaggcac ctctcagcac 4080
 tccagaggaa gcctcaccaa gcctctgcaa tgaggttctt ctgtgcacgt 4140
 tgctgcagct ttgggcctga gatgccagct gtccagctgc tgcttctggc ctgcctgggtg 4200
 tgggatgtgg gggccaggac agctcagctc aggaaggcca atgaccagag tggccgatgc 4260
 cagtatacct tcagtgtggc cagtcccaat gaatccagct gccagagca gagccaggcc 4320
 atgtcagtc tccataactt acagagagac agcagcacc aacgcttaga cctggaggcc 4380
 accaaagctc gactcagctc cctggagagc ctctccacc aattgacctt ggaccaggct 4440
 gccaggcccc aggagacca ggaggggctg cagagggagc tgggcaccct gaggcgggag 4500
 cgggaccagc tggaaacca aaccagagag ttggagactg cctacagcaa cctcctccga 4560
 gacaagtcag ttctggagga agagaagaag cgactaaggc aagaaaatga gaatctggcc 4620
 aggaggttgg aaagcagcag ccaggaggta gcaaggctga gaaggggcca gtgtccccag 4680
 acccgagaca ctgctcgggc tgtgccacca ggctccagag aaggtaagaa tgcagagtgg 4740
 ggggactctg agttcagcag gtgatatggc tcgtagtgc ctgctacagg cgctccaggc 4800
 ctccctgcct gcccttctc ctagagactg cacagctagc acaagacaga tgaattaagg 4860
 aaagcacagc gatcaccttc aagtattact agtaatttag ctctgagag cttcatttag 4920

attagtgggt cagagttctt gtgcccctcc atgtcagttt tcacagtcca tagcaaaagg 4980
 agaaataaaa ggaccgggtg agatgtgtct gcatatgagc agtagaaagt tgtcaattgt 5040
 cccttttgaa aaactatcct tttttgaacc tttgctcaga ttgttatttg taccttttga 5100
 tgttaaaatg acctttatct atgaaattac aatagatttg ggaaatgata ataagtggta 5160
 agtttttgtt tatttttaaa tgttcttccc tggcaaaata aagagatggc acctctctgt 5220
 cagttttctt aatatgttgt tctgaaagtt ttcttactca gtccaatctg agaacctctg 5280
 cttttaagtc atcagacaaa ttcttgagat ggctttttct gagaggctct tctgttcac 5340
 ctgggtccctt cttgcctaaa ggtgagtctg tgtgtgtgtg ggggggggtg gggggtgagg 5400
 tgttggggga ggtcttctta ttagctggga agatgggtatt tgtgtcactt tttgtgaaag 5460
 tgggctccca aatattccct gttgaggaag tgttctaata atgaggaaat aagcaagcaa 5520
 atccagttgt tggacaatta gtttggactg gtcaaagatg tcagtgccaa ggaagaaaga 5580
 aaaaaggggt ggggaagggc ttgttctata ttaaagagac taaagaaatg tgtaaccaa 5640
 atgtagtga tgagtcttga ttggtgtctt catccaaggg ggaaaaaggc tatgaggaac 5700
 aggtttggga taactgaggc aatttgactg ctcattatta tgttactgta ttaatgttca 5760
 gtttcttggt gagataatga tactgtgggt gcgaaggata aaatctttgt tctatggaga 5820
 tacatgctta agtaccagg gtgaggcgtc aggatgtctg caatttgctc tcaaatggtt 5880
 gaagaaagac tgcaaatata tagataatga gagaaagaaa ggtaaaacaa ctgtggcaaa 5940
 atattaataa ctggtgaatt acaaactggt gaatctaagt atatggggag cttattgtac 6000

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA

based on MYOC gene

<400> 2

ctctagactt ctgcatcacg atgtt

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 3

agctcccat atacttagat tcacc

25

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 4

actaaaccaa cagggaac

19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 5

tggttgtttt gttatcactc

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 6

ctcctccatc agtcacag

18

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 7

gaagtctatt tcatgaaggg

20

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 8

agctctcgtg ttctgtga

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 9.

aaacttttca ccctgacc

18

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 10

ttctctgtgg agttagcag

19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 11

acataaaagtt gctcaaagg

19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 12

ctttgaaatt agacctcctg

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 13

gctgttattt ttctctgtcc

20

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 14

ctaagaatct tgctggca

18

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 15

ttcttacctt ctctggagc

19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 16

ttatggatga ctgacatgg

19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 17

tttatatata ctggggagcc

20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 18

ccattcactc tgcaaact

18

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 19

ggaactcttc tcagaaagat

20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA

based on MYOC gene

<400> 20

aaaagcaaat ggcaatag

18

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 21

gacctaggct tgaatctgt

19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 22

tgctcataca ctatccctc

19

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 23

agtgaggact gatggagc

18

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 24

attcccatta aataaaggc

19

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 25

agtctccagc tcagatgc

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

<400> 26

attgtcaatg aatgcctg

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed DNA
based on MYOC gene

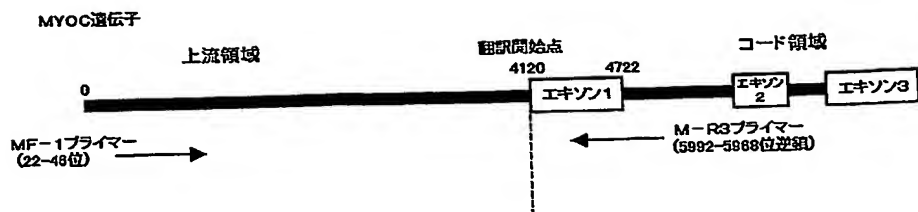
<400> 27

cagtggctctg ggactagg

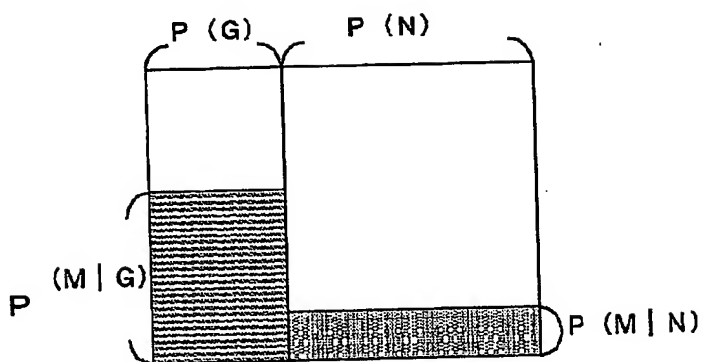
18

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 緑内障関連遺伝子と緑内障発症の関係から、緑内障の発症リスクを事前に予知するための遺伝子の検査方法を提供する。

【解決手段】 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域における塩基の変異を指標として将来の緑内障の発症を予測する。変異の位置が配列番号1で示される塩基配列における194位；199位；324位；1051位；1084位；1627位；1685位；1756位；1853位；2830位；3371位；4037位または4346位のいずれか少なくとも1以上の位置の変異を検出することによる。

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2 0 0 2 - 0 9 3 4 4 3

受付番号

5 0 2 0 0 4 4 9 7 8 0

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0 0 9 4

作成日

平成 1 4 年 4 月 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】

平成14年 3月29日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390014960]

1. 変更年月日

1998年10月 7日

[変更理由]

名称変更

住 所

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

氏 名

シスメックス株式会社